Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg-L.
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Baur †)

Beeinflussung der Anionenpermeabilität der roten Blutkörperchen durch Harnstoff in eine elektive Durchlässigkeit für Kationen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg

vorgelegt von

Hubert Krüger
aus Dortmund

1937

BUCHDRUCKEREI ROBERT BLUME, COSWIG BEZ. DRESDEN

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg-L.
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Baur †)

Beeinflussung der Anionenpermeabilität der roten Blutkörperchen durch Harnstoff in eine elektive Durchlässigkeit für Kationen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg

vorgelegt von
Hubert Krüger
aus Dortmund

BUCHDRUCKEREI ROBERT BLUME, COSWIG BEZ. DRESDEN

Angenommen von der Medizinischen Fakultät Marburg
am 2. VI. 1937.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Referent: Dozent Dr. Gremels.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern

Nach der von „Michaelis“ aufgestellten, und von „Mond“ bewiesenen Theorie, sollte die Anionenpermeabilität der roten Blutkörperchen auf in ihrer Membran vorhandene, positiv geladene Phasen zurückzuführen sein. „Mond“ hat in seiner Arbeit gezeigt, daß diese Annahme richtig ist. Es gelang ihm durch OH-Ionen diese Membranphase umzuladen und damit den Effekt der elektiven Ionenpermeabilität umzukehren. Dieser Umkehrpunkt liegt, wie die Arbeit beweist, zwischen pH = 8 und pH = 8,3.

Von den eben aufgezählten Ergebnissen ging der Gedanke aus, durch Zuführung von Harnstoff in verschiedenen Konzentrationen innerhalb der Grenzen pH = 8 und pH = 8,3 diese Ionenpermeabilität zu ändern. Harnstoff wurde aus zwei Gründen genommen:

1. kommt er nicht nur im Harn, sondern auch stets im Blute vor. Seine Menge ist jeweils abhängig von der Ernährungsweise. Sie vergrößert sich bei eiweißreicher Nahrung. Bei Nephritiden und Urämie steigt der Gehalt im Blut, wie von „Neuberg“ gezeigt wurde. „Baglioni“ hat bewiesen, daß dieser im Blut vorhandene Harnstoff für Blutkörperchen permeabel ist, also gleichmäßig im Plasma wie im Blutkörperchen vorkommt. Außerdem zeigt der gleiche Verfasser in seiner Arbeit, daß dieser Harnstoffgehalt des Blutes von großer Bedeutung ist als notwendige Lebensbedingung für das Herz und wahrscheinlich auch für alle anderen Organe und Gewebe.

2. besitzt der Harnstoff auch bei größerer Konzentration in Lösungen nur ein geringes Molekularvolumen. Damit aber erfüllt er eine wichtige Eigenschaft, denn Membranen, die entweder nur für Kationen oder Anionen durchlässig sind, dürfen Substanzen mit größerem Molekularvolumen nicht durchlassen. Es ist nämlich erwiesen, daß bei Steigerung der Allgemeindurchlässigkeit sich der besondere Unterschied in der Diffusibilität gegensätzlich geladener Ionen mehr und mehr verwischt. (Michaelis).

Seit den Kataphoreseuntersuchungen von „Höber“ wissen wir nun, daß wir in der Plasmahaut der roten Blutkörperchen eine Membran haben, die allen diesen Anforderungen genügt. Aus ihnen geht hervor, daß in der Blutkörperchenmembran positive und negative Phasen vorhanden sind, nur sind die positiven bei weitem

zahlreicher als die negativen und daher auch für die charakteristische Ionenpermeabilität verantwortlich zu machen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, durch Zugabe von Harnstoff vielleicht eine Umladung der Membranphase herbeizuführen, die unabhängig sein sollte von der von „Mond" experimentell bewiesenen Annahme, daß Blutkörperchen für Anionen impermeabel und für Kationen durchlässig werden, wenn man die Blutkörperchen in Lösungen suspendiert, die so alkalisch sind, daß die negative Umladung der Membranphase zustande kommt. Ob der Harnstoff nun eine Änderung in der vorstehenden, bewiesenen Tatsache hervorruft, sollen die nachfolgenden Versuchsreihen beweisen, die in strenger Anlehnung an die „Mondschen" Versuche ausgeführt wurden, nur, daß jeweils ein Teil der von „Mond" verwendeten 10,5prozentigen Rohrzuckerlösung durch eine 10,5prozentige Rohrzuckerlösung, in der ein gewisser Prozentsatz Harnstoff gelöst war, ersetzt wurde. Da der Umkehrpunkt der elektiven Ionendurchlässigkeit zwischen pH = 8 und pH = 8,3 liegt, wurden auch nur Versuchsreihen angesetzt, die zwischen diesen Werten lagen.

Methodik: Defibriniertes Schweineblut wird eine Stunde zentrifugiert, das Serum abgehoben und der gut durchgemischte, ungewaschene Blutkörperchenbrei in Lösungen mit steigendem NaOH-Zusatz und verschiedenen Harnstoffkonzentrationen eingetragen, umgeschüttelt und 25 Min. stehen gelassen. Das Blutkörperchenvolumen der einzelnen Lösungen wurde in geeichten Hämatokriten bestimmt. Die Lösungen selbst wurden eine halbe Stunde zentrifugiert (Zentrifuge: 4000 Touren), die Zwischenflüssigkeit dann abgehoben und sofort in Reagenzgläsern eingeschmolzen, um möglichst gleichbleibende Verhältnisse zu haben. Auf diese Weise gelang es, mehrere Versuchsreihen mit derselben Zwischenflüssigkeit anzusetzen. Dadurch ergaben sich für jeden einzelnen Versuch innerhalb der Versuchsreihe mehrere Kontrollwerte. Aus diesen Werten wurde dann jeweils das Mittel genommen. Chlor wurde nach der von „Rusznyak", Kalium nach der von „Kramer und Tisdall" angegebenen Methode bestimmt und pH in der Gaskette bei 20,9° C gegen gesättigte Kalomelelektrode gemessen. Kontrollmessungen wurden unter glei-

chen Bedingungen mit Standardacetat ausgeführt. Entsprechend den „Mondschen“ Versuchen wurde als Suspension eine isotonische Rohrzuckerlösung (10,5 %) verwandt, da „Mond“ fand, daß die Resistenz der Blutkörperchen gegen Alkali in diesen Lösungen ganz wesentlich gesteigert wird. Alle zur Verwendung gekommenen Reagenzien waren halogenfrei. Jeder Versuch wurde viermal angesetzt um geringe Titrationsunterschiede, die bei allen Mikrobestimmungen vorkommen, nach Möglichkeit auszuschalten. Die eingeschmolzenen Lösungen wurden stets im Eisschrank bei gleichbleibender Temperatur aufbewahrt.

Nach „van Slyke, Hastings, Heidelberger und Neill“ geht die Verteilung der Anionen auf Blutkörperchen und Zwischenflüssigkeit

Tabelle I.

Blutmischung	Blutkörperchen volumen	Chlor innen mg %	Chlor außen mg %	Chlor i. / Chlor au.	Kalium außen mg	pH.
5 ccm Brei, + 7 „ R. Z.	4,09	183,6	30,1	6,09	0,29	7,21
5 ccm Brei + 0,1 „ n/1 NaOH 6,9 „ R. Z.	3,9	127,5	86,21	1,4	0,301	7,43
5 ccm Brei + 0,1 „ n/1 NaOH 0,9 „ R. Z. 6,0 „ H.	3,82	128,62	88,2	1,4	0,31	7,53
Zum Vergleich die entsprechenden „Mondschen“ Versuche:						
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,08	186,5	31,4	5,94	0,28	6,92
5 ccm Brei + 0,1 „ n/1 NaOH 6,9 „ R. Z.	3,8	113,0	70,8	1,6	0,29	7,51

nach dem Donnangleichgewicht vor sich. Dagegen folgt die Verteilung der Kationen diesem Gesetze nicht, da die Membran der Blutkörperchen für diese undurchlässig ist. Aus den Donnangleichgewicht ergibt sich, wie „van Slyke“ festgelegt hat, daß der Quotient Chlorionen innen zu Chlorionen außen mit zunehmender OH-Ionenkonzentration abnimmt.

Die von „Mond“ gefundenen Werte sind zur Kontrolle mit den neu gefundenen (Tab. I) verzeichnet. Neu im Gegensatz zur „Mondschen“ Versuchsreihe ist hier, daß 6 ccm Rohrzuckerlösung (in der Tabelle als R. Z. bezeichnet), durch 6 ccm R. Z. ersetzt wurden, in der 9,6% Harnstoff (in der Tabelle als H. bezeichnet) gelöst waren.

Zugesetzt war 0,1 ccm n/1 NaOH. Betrachtet man nun die Chlorkonzentrationen in Blutkörperchen und Außenflüssigkeit, die in mg% angeführt sind, so sieht man, daß bei Zufügung von NaOH das Verhältnis Chlor innen zu Chlor außen abnimmt. Der Vorgang, der sich hierbei an den Blutkörperchen abspielt, ist in der „Mondschen“ Arbeit zur Genüge erklärt. Wichtig und neu ist hier, daß der Harnstoff in keiner Weise das Verhältnis geändert hat. Der Binnenchlorgehalt der Blutkörperchen wurde aus dem Chlorgehalt von Gesamtblut, Außenflüssigkeit und Hämatokritwert berechnet.

Da in oben erwähnter Arbeit erklärt und bewiesen worden ist, daß bei einer Reaktion, die alkalischer ist als pH = 8, die Blutkörperchen für Anionen undurchlässig werden, genau wie bei niedrigerem pH die Verteilung der Kationen dem Donnangleichgewicht nicht folgt, so wurden die folgenden Versuche mit 0,2 ccm n/1 NaOH angesetzt, weil dabei pH immer zwischen 7.99 und 8,3 lag, damit also der Umkehrpunkt der Ionendurchlässigkeit erreicht war.

Wir sehen in der Tabelle 2, daß jeweils neben den Versuchsreihen von „Mond“, die wiederholt wurden, dieselben Versuchsreihen angesetzt sind, mit der Ausnahme, daß wieder 6 ccm Rohrzuckerlösung wie in Tabelle I durch verschiedene Harnstoffkonzentrationen ersetzt wurden. Es genügte dabei, Konzentrationen von 2,4% bis zu 12,5% zu nehmen, da bei höher liegenden Konzentrationen eine Hämolyse eintrat. Tiefer liegende beeinflußten die von „Mond“ gefundenen Werte in keiner Weise. Bemerkenswert ist, daß auch

Tabelle II.

Blutmischung	Blutkörperchenvolumen	Chlor innen mg %	Chlor außen mg %	Chlor i. / Chlor au.	Kalium außen mg	pH.
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,06	183,4	30,5	6,01	0,31	7,08
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 6,8 „ R. Z.	3,44	37,5	83,5	0,44	0,39	8,13
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 0,8 „ R. Z. 6,0 „ H. (2,4%)	3,5	39,82	86,0	0,46	0,38	8,33
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,12	179,8	29,88	6,02	0,29	7,07
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 6,8 „ R. Z.	3,7	38,58	84,87	0,45	0,33	8,20
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 0,8 „ R. Z. 6,0 „ H. (4,8%)	3,46	40,23	86,84	0,46	0,32	7,97
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,06	183,5	30,1	6,09	0,30	7,05
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 6,8 „ R. Z.	3,60	39,82	85,91	0,46	0,32	7,93
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 0,8 „ R. Z. 6,0 „ H. (9,6%)	3,51	40,10	86,13	0,46	0,32	7,85

Blutmischung	Blutkörperchen volumen	Chlor innen mg %	Chlor außen mg %	Chlor i. / Chlor au.	Kalium außen mg	pH.
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,22	180,0	29,7	6,06	0,30	7,2
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 6,8 „ R. Z.	3,7	33,61	79,55	0,43	0,37	8,33
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 0,8 „ R. Z. 6,0 „ H.(12,5%)	3,65	33,6	79,65	0,42	0,34	8,23
Zum Vergleich wieder die entsprechenden „Mondschen“ Versuche:						
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,08	186,5	31,4	5,94	0,28	6,92
5 ccm Brei + 0,2 „ n/1NaOH 6,8 „ R. Z.	3,6	52,0	98,0	0,52	0,318	7.99

in diesem Fall die Werte mit und ohne Harnstoff den von „Mond“ gefundenen fast gleichkommen.

Außer dem Chlor ist auch, wie aus beiden Tabellen ersichtlich, der Kaliumgehalt der Außenflüssigkeit in mg verzeichnet. Der erste Wert entspricht, wie auch beim Chlor, der Menge, die im Serum, das der Blutkörperchenbrei noch enthält, vorhanden ist. Trotz der zugefügten OH-Ionenkonzentration bleibt der Kaliumgehalt zunächst noch konstant. Es tritt also kein Kalium aus den Blutkörperchen aus. Soweit bieten die Versuche nichts Neues, aber es ist auch hier zu beachten, daß der Harnstoff die Blutkörperchenmembran durchaus nicht verändert, d. h., der Harnstoff ist nicht in der Lage, den Umkehrpunkt der Ionenpermeabilität zu beeinflussen. Diese Tatsache wird noch augenscheinlicher, wenn man sich die Tabelle III ansieht,

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen wurden jetzt 0,3 ccm NaOH dem Blutkörperchenbrei zugesetzt. Als erstes fällt wieder auf.

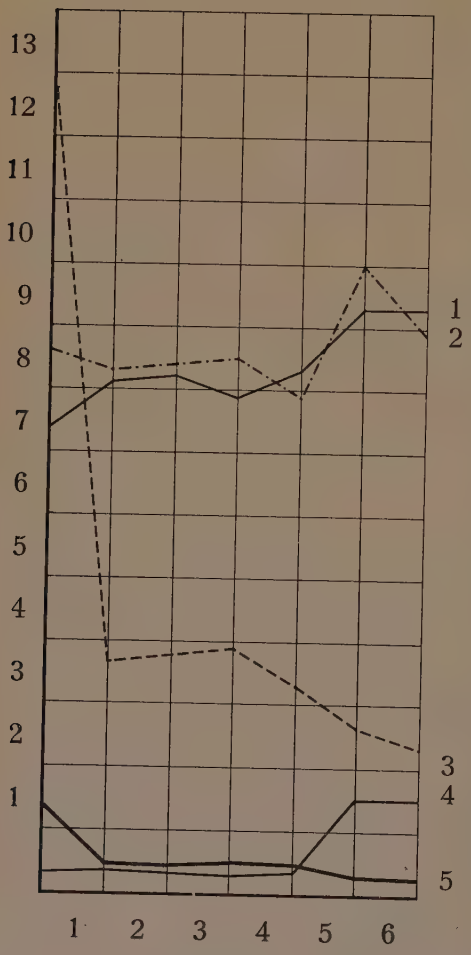
Tabelle III.

Blutmischung	Blutkörperchen volumen	Chlor innen mg %	Chlor außen mg %	Chlor i. / Chlor au.	Kalium außen mg	pH.
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,08	185 4	31,3	5,8	0,29	7,2
5 ccm Brei + 0,3 „ n/1 NaOH 6,7 „ R. Z.	3,32	26,53	100,17	0,26	1,53	9,33
5 ccm Brei + 0,3 „ n/1 NaOH 0,7 „ R. Z. 6,0 „ H. (4,8%)	3,42	26,55	100,17	0,26	1,47	9,42
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	3,99	183,7	30,9	5,9	0,29	7,3
5 ccm Brei + 0,3 „ n/1 NaOH 6,7 „ R. Z.	2,93	23.21	89,53	0,25	1,55	9,37
5 ccm Brei + 0,3 „ n/1 NaOH 0,7 „ R. Z. 6,0 „ H. (9,6%)	3,01	21,63	88,65	0,24	1,57	9,37
Zum Vergleich wieder die entsprechenden „Mondschen“ Versuche:						
5 ccm Brei + 7 „ R. Z.	4,08	186,5	31,4	5,94	0,28	6,92
5 ccm Brei + 0,3 „ n/1 NaOH 6,7 „ R. Z.	3,45	25,1	107,5	0,234	1,21	9,3

daß durch die Hinzufügung von Harnstoff eine Änderung des Gehaltes an Chlor und Kalium nicht erzielt wurde. Dagegen ist pH über 8,3 hinaus gestiegen, und der Kaliumgehalt der Außenflüssig-

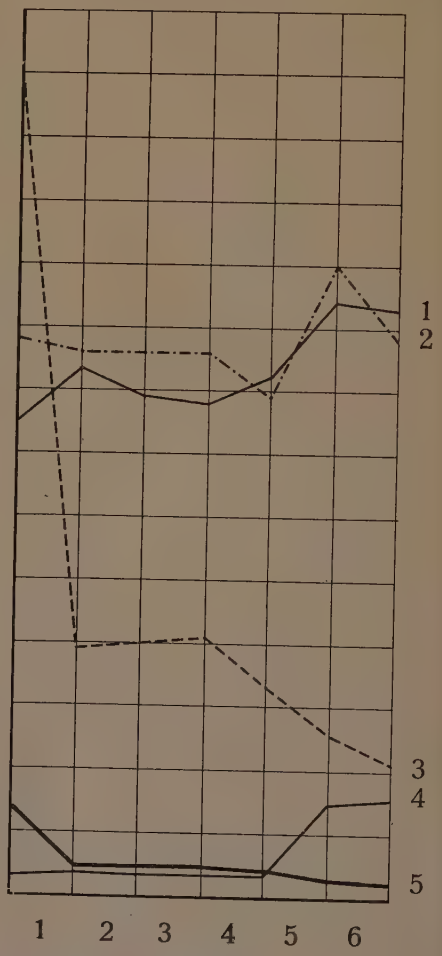
Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse

ohne Harnstoff!



1 = pH
2 = Chlor außen mg %
3 = Chlor innen mg %

mit Harnstoff!



4 = Kalium außen mg
5 = Chlor innen
Chlor außen

keit hat zugenommen. Da aber die Chlorwerte den von „Mond“ gefundenen entsprechen, und dieser gezeigt hat, daß diese Werte nun konstant bleiben, dagegen die Kaliumwerte bei noch höheren NaOH-Konzentrationen steigen, kann durch diese neuen Ergebnisse mit Recht gesagt werden, daß, entsprechend den „Mond'schen“ Versuchen, ohne Rücksicht auf die jeweilige zugefügte Harnstoffmenge die Blutkörperchenmembran für Anionen jenseits pH = 8 impermeabel wird, die Kaliumionen sich aber trotz des Harnstoffes gegen die als NaOH zugesetzten Na-Ionen ausgetauscht haben.

Vergleicht man die graphische Darstellung der einzelnen ohne Harnstoff und mit Harnstoff gefundenen Ergebnisse, so ist es klar ersichtlich, daß die Kurven kaum Unterschiede aufweisen. (Siehe Seite 11a und 11b).

Die geringen Abweichungen sind höchstwahrscheinlich durch kleine Fehlerquellen, mit denen bei jeder Mikrobestimmung zu rechnen ist, hervorgerufen.

„Mond“ stellt sich den Bau der Plasmahaut der roten Blutkörperchen so vor, daß die Stromata in waben- oder netzförmiger Struktur das Blutkörperchen erfüllen. In die Lücken sind Eiweiß- und Lipoidphasen eingelagert. Dabei gehen alle lipoidlöslichen Substanzen durch die Lipoidphasen, die Ionen dagegen permeieren durch die Eiweißphasen. Nach der „Michaelischen“ Theorie stellen diese Eiweißphasen Poren dar, durch die die Ionen hindurchwandern. Demnach wäre auch hier der Ort zu suchen, wo alle Substanzen mit niedrigem Molekularvolumen, also auch vor allem der Harnstoff, durch die Eiweißphasen diffundieren können, ohne dabei irgendeine Änderung der Phase vorzunehmen. Damit wäre auch die Erklärung dafür gegeben, daß der Umkehrpunkt der elektiven Ionendurchlässigkeit durch den Harnstoff garnicht verändert werden kann.

Zusammenfassung.

Die vorliegenden Versuche haben die Richtigkeit der „Mond'schen“ Theorie, daß der Umkehrpunkt der Ionenpermeabilität in der Membran der roten Blutkörperchen zwischen pH = 8 und pH = 8,3 liegt, bestätigt. Neu bei den Versuchen ist, daß der Harnstoff den Umkehrpunkt nicht beeinflußt oder gar ändert. Nach „Mond“ muß für

die elektive Ionendurchlässigkeit eine Membranphase verantwortlich sein, die umladbar ist. Der Umkehr- oder isoelektrische Punkt dieses Ampholyten liegt zwischen pH = 8 und pH = 8,3. Da Lipoide wegen ihrer stark negativen Ladung nicht in Frage kommen, muß die Membranphase aus einem basischen Eiweißkörper bestehen. Ein solcher Eiweißkörper, dessen isoelektrischer Punkt bei pH=8,1 liegt, ist das Globin, wie „Osato" bewies. Der Schluß, der aus dem eben Gesagten und den Versuchsreihen gezogen werden kann, ist also der, daß der Harnstoff durch das Globin diffundiert, sodaß er zu gleichen Teilen im Blutkörperchen wie in der umgebenden Flüssigkeit vorhanden ist. Er beeinflußt dabei aber nicht die Eiweißkörper, sondern diese werden sowohl in Gegenwart von Harnstoff, als auch ohne ihn, als Ampholyte mit Überschreitung ihres isoelektrischen Punktes umgeladen, wie diese Arbeit in Anlehnung an die „Mond'schen" Versuche beweist.

Literaturverzeichnis.

Mond: Pflügers Archiv Bd. 217, Seite 618 — 630, Jhrg. 1927.

Kramer und Tisdall: Bestimmung von Kalium in kleinen Blutmengen. Journ. of biol. chem. Bd. 48, S. 223, Jhrg. 1921.

Rusznyak: Halogenbestimmung. Biochem. Zeitschr. Bd. 114, S. 23 — 26, Jhrg. 1921.

Höber: Pflügers Archiv. Bd. 101, S. 607, 102, 196, Jhrg, 1904.

Hastings: van Slyke, Heidelberger, Neill: Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 481, 507.

Neuberg: Der Harn, sowie die übrigen Ausscheidungen und Körperflüssigkeiten.

Baglioni: Zentralbl. f. Physiol. Bd. 13, S. 385, Jahrg. 1905.

Osato: Zentralbl. f. Physiol Bd. 133, S. 485, Jahrg. 1922.

Zum Schlusse ist es mir angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Baurs, den leider ein tragisches Geschick zu früh seinem Schaffenskreis entriß, zu gedenken. Er gab mir Thema und Anregung zu dieser Arbeit, für die er großes Interesse hatte.

Ebenso bin ich Herrn Dr. Gremels zu Dank verpflichtet, der in liebenswürdiger Weise diese Arbeit übernahm und sie damit zu einem guten Ende führte.

Lebenslauf.

Am 9. September 1909 wurde ich, Hubert Krüger, evangl. Konfession, als Sohn des Volksschullehrers Rudolf Krüger und seiner Ehefrau Frieda, geb. Lemke, in Dortmund geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Peterswalde (Grenzmark) und Dortmund trat ich Ostern 1919 in die Sexta des Dortmunder Bismarck-Gymnasiums ein. Nach einem Wechsel im Jahre 1929 vom Bismarck- auf das Hindenburg-Gymnasium bestand ich hier 1931 meine Reifeprüfung. Nach 5 Semestern legte ich in Marburg a. d. Lahn im April 1934 die ärztliche Vorprüfung ab. Ich studierte dann 2 Semester in Münster i. W. Die letzten 4 Semester verbrachte ich wieder in Marburg, wo ich im Dezember 1936 das medizinische Staatsexamen bestand. Mein praktisches Jahr begann am 30. Dezember 1936 an der Städt. Kinderklinik in Dortmund, an der ich auch jetzt noch tätig bin.

Hubert Krüger.

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg und Münster die Herren Professoren Alverdes, Baur, Boeminghaus, Claußen, Coenen, Dittler, Esch, Freund, Gantenberg, Göppert, Grüneisen, Grüter, Jacobshagen, Jötten, Kehrer, Klapp, Klinge, Kutscher, Mayr, Meerwein, Nauck, Naujoks, Neumann, Pfannenstiel, Schilling, Schwenkenbecher, Uffenorde, Többen, Versé, Vogt.